DETECÇÃO DE *Leishmania (V.) braziliensis* ATRAVÉS DE qPCR EM AMOSTRAS DE SALIVA DE PACIENTES DO ESTADO DE PERNAMBUCO, ÁREA ENDÊMICA PARA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA

K. P. B. DE LIMA¹, A. K. S. F. SILVA¹, J. F. C. L. S. MONTEIRO, E. L. ALMEIDA¹, B. S. L. F. DE SÁ², S. P. BRANDÃO FILHO¹, M. E. F. BRITO¹

¹ Departamento de Imunologia, Laboratório de Imunoparasitologia, Instituto Aggeu Magalhães, FIOCRUZ-PE

² Departamento de Microbiologia do Instituto Aggeu Magalhães, FIOCRUZ-PE
E-mail para contato: karinaabaracho@gmail.com

RESUMO- As leishmanioses são causadas por várias espécies de protozoários do gênero *Leishmania*, que acometem pele e/ou mucosas e vísceras. Essas doenças são caracterizadas por apresentarem diferentes manifestações clínicas e epidemiológicas. A espécie de *L. (V.) braziliensis* (a principal encontrada em Pernambuco) pode causar desde a forma de pele- evoluindo para cura espontânea; como a forma mucosa – que pode causar lesões desfigurantes a leishmaniose tegumentar americana (LTA). Os indivíduos participantes da pesquisa foram de ambos os sexos, com várias idades, oriundos do município de Moreno, Região Metropolitana do Recife, Pernambuco, Brasil. Esses pacientes foram recrutados após anamnese a partir de demanda espontânea no serviço de dermatologia do Hospital Oswaldo Cruz e foram obtidas amostras de saliva através do método de coleta não invasiva. Essas foram transportadas ao Laboratório de Imunoparasitologia do Departamento de Imunologia do Instituto Aggeu Magalhães - FIOCRUZ-PE, onde foram submetidas ao teste molecular (qPCR), para o alvo *kDNA1*, específico para o diagnóstico da infecção. Além desse, foram feitos os testes convencionais utilizados para a identificação da doença (pesquisa direta e cultura). Do total de 35 amostras de fluido salivar, dez apresentaram-se compatíveis com LTA. Esses resultados mostram o potencial da coleta não-invasiva, como amostra de escolha para o diagnóstico com boa performance quando associada ao teste molecular. A coleta não invasiva, aqui demonstrada, é um método sensível, prático e confortável ao paciente, podendo também ser utilizado em pediatria. Além de permitir a detecção e quantificação por qPCR do DNA de *Leishmania spp.*, a saliva usada em técnica de diagnóstico, pode auxiliar a confirmação da LTA, visando o bem estar e saúde do paciente.

Palavras-chave: Fluido salivar. Diagnóstico. Leishmaniose.

ABSTRACT – Leishmaniasis are caused by several protozoan species of the genus “*Leishmania*” and affect skin, mucous membranes or viscera. These diseases are characterized by different clinical and epidemiological manifestations. The “*L. (V.) braziliensis*” (the main specie found in Pernambuco State) can cause skin

leishmaniasis – which can evolve till spontaneous cure; as so the mucous membrane's form – which can cause disfiguring lesions on american cutaneous leishmaniasis (ACL). The Individuals of the research were from both sexes, with various ages and coming from municipality of Moreno, metropolitan region of Recife, Pernambuco State, Brazil. Patients were recruited after an anamnesis from spontaneous demand of Dermatology Service of Oswaldo Cruz Hospital and from all were collected a non-invasive clinical sample: salivary fluid. The samples were taken to Aggeu Magalhães Institute – FIOCRUZ/PE, where they were submitted to a molecular test (qPCR) which uses as a target the kDNA1, specific to detect the infection caused by "L. (V.) braziliensis". In addition to molecular technique, other conventional tests were performed to confirm the disease. From a total of 35 salivary fluid, ten had compatible results with ACL by qPCR. These results show the potential, as sample of choice for diagnosis, of a non-invasive collection technique with good performance when associated with the test. The non-invasive collect method, demonstrated here, is sensitive, practical and a comfortable to patient, can be also used in pediatrics. Beside to allowing detection and quantification of DNA from "Leishmania spp.", salivary fluid as a diagnostic approach may auxiliary on ACL confirmation, aiming the patient wellness and health.

Keywords: Salivary fluid. Diagnosis. Leishmaniasis.

1. INTRODUÇÃO

As leishmanioses são enfermidades de grande importância para saúde pública mundial, causadas por várias espécies de protozoários da ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae. São transmitidas entre os vertebrados pela picada das fêmeas infectadas de diversas espécies de flebotomíneos da ordem Diptera, gênero *Lutzomyia*, subgênero *Psychodopygus*, durante o repasto sanguíneo (SHAW; LAINSON, 1987).

Compreende um espectro de doenças que se diferenciam entre os locais de ocorrência em função das variáveis relacionadas aos parasitos, vetores, ecossistemas, fatores ocupacionais, lazer e riscos individuais, em particular a infecção com HIV (SCHWARTZ, HATZ, BLUM, 2006).

Os métodos clássicos disponíveis para o diagnóstico da LTA não apresentam a eficácia e aplicabilidade desejada. Sendo assim, é necessário avaliar a história epidemiológica (procedência), social (hábitos e profissão), aspectos clínicos (sinais e sintomas) e a confirmação laboratorial dos casos o que pode ser realizado através dos métodos parasitológicos (exame direto e cultura), imunológicos (Intradermoreação de Montenegro - IDRM, reação de imunofluorescência indireta - RIFI, testes imunoenzimáticos (Enzyme linked immunosorbent assay-ELISA) e *Western blotting* (WB) e moleculares).

A busca por novos métodos de diagnósticos em amostras não invasivas tem sido realizada na tentativa de minimizar os incômodos causados aos pacientes pelas técnicas convencionais, e ainda a diminuição de recursos e técnicos experientes na coleta que os métodos invasivos requerem. Neste contexto, a utilização de um procedimento não invasivo assume grande importância para o diagnóstico.

De acordo com CORVALAN et al., 2011 a capacidade e velocidade de identificação de parasitos compreendem as principais vantagens das técnicas baseadas na detecção de DNA como a proposta em saliva. Com os avanços da biologia molecular houve o desenvolvimento e aprimoramento de diversas

ferramentas para o auxílio na identificação de doenças, permitindo prognósticos e diagnósticos mais precisos.

A qPCR é uma das ferramentas aprimoradas dentre os métodos moleculares para auxiliar no enfrentamento às Leishmanioses. Os benefícios da qPCR em relação à PCR convencional destaca-se a capacidade quantitativa, reprodução e rapidez quanto as amostras analisadas. Além das vantagens operacionais, é uma técnica sensível e reprodutível podendo substituir a PCR convencional nas rotinas de diagnóstico laboratorial (PAIVA-CAVALCANTI, M et al. 2010).

O presente estudo propõe contribuir com os aspectos clínicos, epidemiológicos da LTA em Pernambuco e avaliar o desempenho do método de coleta de fluido salivar em associação à técnica diagnóstica de qPCR objetivando segurança adequada e precisão no diagnóstico da doença.

2.MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Área

O estudo foi desenvolvido em diversas localidades da Região Metropolitana do Recife, estado de Pernambuco, Brasil. Distancia 55.7 km da capital, compreende uma área de 195.603 km², e uma densidade populacional de 311.94 in hab./km². Atividade econômica predominante nessa região é o cultivo da cana-de-açúcar. As casas são construídas em Mata Atlântica remanescentes, com a presença do homem e de animais domésticos (cão, cavalo, gato e ovelhas). O principal vetor é o *Lutzomyia whitmani*, responsável pela transmissão nessa região é a *L. (V.) braziliensis*.

2.2 População humana

Um total de 44 pacientes suspeitos de LTA procurou o ambulatório do Hospital Oswaldo Cruz da cidade do Recife, Pernambuco, Brasil. Os referidos foram examinados pela dermatologista. Os pacientes foram oriundos dos municípios: Paulista, Jaboatão dos Guararapes, Paudalho, Goiânia e Moreno, Pernambuco, nordeste do Brasil, área endêmica de LTA. Antes da coleta de amostra, os pacientes foram instruídos sobre a pesquisa e solicitados a assinarem o termo de consentimento aprovado pelo Comitê de Ética do IAM/FIOCRUZ-PE (IAM), sob o No. 038/11.

1.3 Amostras

O fluido salivar foi dispensado dentro de um coletor de 80 ml estéril, a amostra biológica foi transportada separadamente sob refrigeração. As referidas amostras foram armazenadas em freezer a -20° no Laboratório de Imunoparasitologia do Departamento de Imunologia do IAM-FIOCRUZ-PE.

2.4 Extração e quantificação

O DNA de *Leishmania* foi extraído seguindo o protocolo de extração in silico conforme descrito por (DA SILVA, 2017). Após a extração o DNA foi quantificado em Nanodrop Lite (Termo Scientific) e armazenado em freezer a -20 no Laboratório de Imunoparasitologia do Instituto Aggeu Magalhães IAM-FIOCRUZ-PE, até ser utilizado.

2.5 Real Time (qPCR)

As amostras de DNA foram submetidas à técnica de quantificação por Real-time PCR (qPCR), conforme descrito por (Paiva-Cavalcanti e colaboradores ;2013). Este sistema utiliza o kDNA como alvo de detecção à região variável do minicírculo do cinetoplasto de *Leishmania (V.) braziliensis*, amplificando um fragmento de 750 pb.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Como evidenciado o estudo foi realizado com um total de 35(trinta e cinco) pacientes onde 22,85% correspondem ao sexo feminino e 77,15% ao sexo masculino. Dentre estes, 10 (dez) foram positivos para LTA sendo 70% do masculino, utilizando a técnica de qPCR. Na tabela abaixo foram incluídos ainda outros métodos de diagnóstico auxiliares como o isolamento e pesquisa direta (Tabela 1).

Tabela 1 - Característica clinica epidemiológica e laboratorial dos indivíduos com LTA.

PACIENTES	SEXO	IDADE (anos)	PROCEDÊNCIA	F.CLINICA	Nº DE LESÕES	T. DE EVOLUÇÃO	LOCAL LESÃO	TAMANHO LESÃO (cm²)	PESQUISA DIRETA	CULTURA	qPCR
SI H01	F	72	PAULISTA	ULCERADA	1	10 MESES	MÃO D	1,5x1,6	+	-	+
SI H03	M	22	PAUDALHO	ULCERADA	1	1MÊS	ANTEBRAÇO D	05X05	+	-	+
SI H04	M	24	PAUDALHO	ULCERADA	1	2 MESES	MÃO E	05X05	+	-	+
SI H012	F	49	J. GUARARAPES	ULCERADA	1	16 DIAS	PERNA E	1,5X1,5	+	-	+
SI H014	M	50	MORENO	ULCERADA	1	2MESES	TIBIA ANTERIOR E	2X1,5	+	-	+
SI H019	M	22	PAUDALHO	ULCERADA	1	2 MESES	ANTEBRAÇO E	2X10	+	-	+
SI H020	M	17	MORENO	ULCERADA	1	2MESES	JOELHO D	3X4,5	+	-	+
SI H025	F	12	MORENO	ULCERADA	2	2 MESES	MÃO E BRAÇO E	5X3/3X2	+	-	+
SI H026	M	29	MORENO	PLACA	1	1 MES E 15 DIAS	PATELA E	2,5X2,0	+	+	+
SI H032	M	55	GOIANA	ULCERADA	1	45 DIAS	PERNA E	4X3	+	-	+

Legenda: Positivo (+), Negativo (-), Esquerda (E), Direita (D)

Gráfico 1- Curva de melting com uma amostra de saliva positiva para *L. (V.) braziliensis* com pico de temperatura de 78,08°C (específico para essa espécie).

Legenda: Eixo y (Temperature): Variação de temperatura em graus Celcius. Linha laranja representando curva de dissociação de melting de amostra clínica. Eixo X (Derivative Repórter): Eixo da derivada.

Gráfico 2- Curva de melting com uma amostra positiva (laranja) e curva de diluição com DNA genômico de cepa de *L. (V.) braziliensis* (vermelho).

Legenda: Eixo y (Temperature): variação de temperatura da curva de melting. Amostras positivas para *L. (V.) braziliensis* com pico no intervalo entre 78° e 80°C. Eixo X (Derivative Repórter): Eixo da derivada.

O diagnóstico laboratorial da LTA é de fundamental importância, em virtude da dificuldade para a definição dos casos, que envolve o diagnóstico diferencial com outras dermatoses granulomatosas e da dificuldade do tratamento dos pacientes, principalmente pelos sérios efeitos colaterais dos medicamentos utilizados (GONTIJO; CARVALHO, 2003; ALVAR et al 2012).

O avanço tecnológico do século XX favoreceu o desenvolvimento de uma variedade de técnicas laboratoriais e trouxe uma importante contribuição ao diagnóstico das doenças em geral e das infecciosas em particular, entretanto o diagnóstico da LTA ainda não é satisfatório, provavelmente por se tratar de doença negligenciada, e pela sua própria complexidade.

A definição dos casos da LTA inclui informações epidemiológicas, aspectos clínicos e exames laboratoriais e frequentemente é necessária a associação desses elementos (RODRIGUES et al, 2002). Outra importante limitação no diagnóstico da LTA é a coleta das amostras de material dos pacientes para exame. A coleta de material das lesões é feita geralmente empregando métodos invasivos como biópsia, escarificação, punção aspirativa da borda da lesão, que causam desconforto e são particularmente de difícil execução em crianças e nas lesões na face ou em outras partes delicadas do corpo do paciente. Procedimentos como a biópsia exigem técnicos especializados e pode ser feita apenas por especialista em ambiente hospitalar, e ainda pode aumentar o risco de infecções secundárias por bactérias.

Métodos alternativos para coleta de amostras biológicas para o diagnóstico de LTA têm sido buscados com o objetivo de proporcionar maior

conforto aos pacientes. O método por fluido salivar demonstra ser então uma alternativa válida para o diagnóstico de Leishmaniose, podendo ser aplicado em situações de trabalho de campo, por exemplo, que requer uma coleta rápida e de fácil manuseio, ou ainda em pediatria devido à dificuldade na coleta de amostras em crianças. Além disto, por ser um fluido orgânico dispensando em um recipiente estéril a obtenção é de baixo custo e em termos de biossegurança o risco de contaminação é praticamente inexistente, como descrito por (CORVALAN et al., 2011).

Esta porcentagem elevada de 70% de positividade para indivíduos do sexo masculino pode-se explicar pela atividade agrícola predominante na localidade do estado, áreas endêmicas de LTA (BRITO et al., 2012).

Todos os pacientes positivos estiveram dentro dos parâmetros estabelecidos pela técnica de qPCR, obtendo-se 28,57% de positividade. Como demonstrado abaixo em (Gráfico 1 e 2) em todas as amostras positivas houve emissão de fluorescência com um pico entre as amplitudes 79°C e 81°C como descrito por (PAIVA-CAVALCANTI, M et al. 2013).

O procedimento ainda requer maiores estudos para uma análise mais detalhada e robusta quando a aplicação para possível validação da técnica. Porém mostra-se rentável, prática e rápida em relação às ferramentas convencionais.

4. CONCLUSÃO

O método de coleta não invasivo através da amostra de saliva associado à qPCR, confirma a detecção de *Leishmania (V.) braziliensis*.

5. REFERÊNCIAS

ALVAR, J., VÉLEZ, I.D., BERN,C.,HERRERO, M., DESJEUX, P., CANO, J., WHO. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. ***PloS ONE***, San Francisco, 7:01-12, 2012.

BRITO M.E.F, ANDRADE M.S, DANTAS-TORRES F, RODRIGUES, E.H.G., CAVALCANTI, M.D. P., ALMEIDA, A.M.P.D., & BRANDÃO-FILHO, S.P. Cutaneous leishmaniasis in northeastern Brazil: a critical appraisal of studies conducted in State of Pernambuco. ***Rev Soc Bras Med Trop***. 2012; 45: 425- 429, 2012

CORVALAN, F. H. SAMPAIO, R.N.R., BRUSTOLONI, Y.M., ANDREOTTI, R., & JÚNIOR, L. DNA identification of *Leishmania (Viannia) braziliensis* in human saliva from a patient with American cutaneous leishmaniasis. ***Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases***, v. 17, n. 1, p. 98-102, 2011.

GONTIJO B, CARVALHO M.L.R. Leishmaniose tegumentar americana. ***Rev Soc Bras Med Trop***. 36:71-80, 2003

DA SILVA, A.O. Avaliação de protocolos de extração e purificação de DNA alvo da reação em cadeia da polimerase na detecção de *Leishmania (Viannia)* spp.. 2017. 77 f. Dissertação (Mestrado em Biociências e Biotecnologia em Saúde) – Instituto Aggeu Magalhães, Recife, 2017.

DE PAIVA CAVALCANTI, M., DANTAS-TORRES, F., DE ALBUQUERQUE, S.D.C.G., DE MORAIS, R.C.S., DE BRITO, M.E.F., OTRANTO, D., & BRANDÃO-FILHO, S. P. Quantitative real time PCR assays for the detection of *Leishmania (Viannia) braziliensis* in animals and humans. **Molecular and cellular probes**, v. 27, n. 3, p. 122-128, 2013.

PAIVA-CAVALCANTI, M.; REGIS-DA-SILVA, C.G.; GOMES, Y.M. Comparison of real-time PCR and conventional PCR for detection of *Leishmania (Leishmania) infantum* infection: a mini-review. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 16, n. 4, p. 537-542, 2010.

RODRIGUES, E.H.G., DE BRITO, M.E.F., MENDONÇA, M.G., WERKHÄUSER, R.P., COUTINHO, E.M., SOUZA, W.V., ABATH, F.G. Evaluation of PCR for diagnosis of American cutaneous leishmaniasis in an area of endemicity in northeastern Brazil. **Journ Clin Microbiol**, Washington, 4:3572-6, 2002.

SCHWARTZ E, HATZ C, BLUM J. New world cutaneous leishmaniasis in travelers. **Lancet Infect. Dis.**, v. 6, p. 342–349, 2006.

SHAW J.J, LAINSON R. Ecology and epidemiology: New World. In: The Leishmaniasis in Biology and Medicine (Volume I). Peters W, Killick-Kendrick R (Eds). **Academic Press**, London, UK, p. 291–363, 1987.

6. AGRADECIMENTOS

CNPq, CAPES, FACEPE e IAM/FIOCRUZ-PE.